



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

Efecto antimicótico del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* frente a *Trichophyton rubrum* ATCC10218 comparado a terbinafina, en un estudio in vitro.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Médico Cirujano

AUTOR:

Florián López Antony Napoleón (ORCID: 0000-0002-5430-5710)

ASESORES:

Dra. María Rocío del Pilar Llaque Sánchez (ORCID: 0000-0002-6764-4068)

Dra. Yupari Azabache, Irma Luz (ORCID: 0000-0002-0030-0172)

Mg. Jaime Abelardo Polo Gamboa (ORCID: 0000-0002-3768-8051)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades Infecciosas y Transmisibles

TRUJILLO - PERÚ

2020

DEDICATORIA

A mis padres, Pedro Florián y Martha López...

Quienes me enseñaron a través del ejemplo, a cumplir mis metas trazadas, me ayudaron y guiaron incondicionalmente, apoyaron todos los proyectos que tuve. Gracias por estar presentes en las etapas de mi vida ofreciéndome lo mejor para mi persona.

Con amor y gratitud:

Antony Napoleón Florián López.

AGRADECIMIENTO

A mis asesores:

Gracias Dra. Llaque Sánchez, Dra Yupari Azabache y Mg Jaime Polo, por la dedicación, tiempo y esfuerzo empleado en la elaboración de este proyecto de investigación, sin ustedes este trabajo no hubiera sido posible.

Mis sinceros agradecimientos:

FLORIÁN LÓPEZ, ANTONY NAPOLEÓN

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	5
III. MÉTODO.....	10
3.1 TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN:	10
3.2 VARIABLES (Anexo 03).....	10
3.3 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO	10
3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD	11
3.5 PROCEDIMIENTO:.....	11
3.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS.....	12
3.7 ASPECTOS ÉTICOS:	12
IV. RESULTADOS	13
V. DISCUSIÓN.....	17
VII. RECOMENDACIONES.....	20
Referencias Bibliográficas.....	21
ANEXOS	34

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Análisis descriptivo de los halos de inhibición del Efecto antimicótico del aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC10218 comparado a terbinafina, en un estudio in vitro.16
Tabla 02. Análisis de Varianza de las medias del Efecto antimicótico del del aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC10218 comparado a terbinafina, en un estudio in vitro.16
Tabla 03. Valoración Post ANOVA del Efecto antimicótico del aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC10218 comparado a terbinafina, en un estudio in vitro.17

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 01. Diagrama de caja de los halos inhibitorios por los grupos estudiados del aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC10218 comparado a terbinafina, en un estudio in vitro.18
--	---------

RESUMEN

En el presente trabajo, se evaluó el efecto antimicótico del aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, frente a *Trichophyton rubrum* ATCC10218, en comparación con terbinafina 25µg, in-vitro, empleándose 10 repeticiones por cada grupo de estudio. Se evidencio efecto antimicótico a concentraciones de 100% (25.20mm, DS±1.229 IC95% 24.32 – 26.08), sin embargo, terbinafina demostró un mayor halo de inhibición (33 mm, DS±1.491 IC95% 31.93 – 34.07), las concentraciones de 75% y 75% demostraron zonas de inhibición inferiores. El análisis de varianza de los grupos en estudio (ANOVA), indico que existen diferencias significativas entre ellos. ($p<0.05$). El análisis Post Anova, evidencio la diferencia intergrupos a fin de identificar aquel que muestra mejores resultados, en el estudio el mejor efecto antimicótico lo tiene terbinafina, superando a los demás grupos analizados.

Palabras clave: *Eucalyptus globulus*, *Trichophyton rubrum*, terbinafina, efecto antimicótico.

Abstract

This study evaluated the antifungal effect of the essential oil of *Eucalyptus globulus* against *Trichophyton rubrum* ATCC 10218, compared with terbinafine 25µg, in-vitro, using 10 replicates per study group. Antifungal effect was evident at concentrations of 100% (25.20 mm, SD \pm 1.229 CI 95% 24.32 - 26.08), however, terbinafine showed a higher inhibition zone (33mm, SD \pm 1.491 CI 95% 31.93 - 34.07), concentrations of 50% and 75% showed lower inhibition zones. The analysis of variance of the groups under study (ANOVA), indicated that there are significant differences between them ($p < 0.05$). The Post Anova analysis showed the inter-group difference in order to identify the one that shows better results, in the study the best antifungal effect is terbinafine, surpassing the other groups analyzed.

Keywords: *Eucalyptus globulus*, *Trichophyton rubrum*, terbinafine, antifungal effect.

I. INTRODUCCIÓN.

Las micosis son infecciones que por lo general afectan al estrato córneo de piel y anexos, siendo la especie dermatofito la más implicada en la mayoría de casos de tiña pedis, tiña unguium y tiña corporis, su invasión está relacionada con la capacidad de sintetizar la queratina por lo cual son considerados antropofílicos por ser, el hombre, su principal hábitat natural. El *Trichophyton rubrum*, es un hongo filamentoso, de amplia distribución mundial, capaz de producir enfermedades en estructuras queratinizadas (piel, pelo, uñas).¹

A la fecha entre el 20% al 25% de las personas alrededor de todo el mundo, posee una infección micótica superficial, esto se ha evidenciado debido al: aumento de la población, esperanza de vida, enfermedades inmunológicas, uso frecuente de piscinas, intercambio de artículos de higiene personal, uso de zapatos cerrados, entre otros. A nivel de Latinoamérica se identificaron a los dermatofitos más frecuentes obteniendo el *Trichophyton rubrum* el primer lugar con el 70%.²

El Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión, realizó un estudio epidemiológico con un número de población de 12.990 pacientes con presunción de onicomycosis obteniendo y procesando muestras en el laboratorio de micología del instituto D.AC, arrojando como resultado positivo 7118 casos. De las muestras obtenidas durante 30 años se logró identificar al *Trichophyton rubrum*, como el principal agente etiológico de las dermatomicosis (33.2%) esto se debe en parte a la posibilidad de esta especie a desarrollar resistencia a los antifúngicos empleados.³

Se pueden clasificar a los dermatofitos en 3 géneros: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*. Existen un total de 50 especies, de las cuales aproximadamente 20 son patógenas para el ser humano, siendo el *Trichophyton* (el más frecuente) con cerca de 30 especies, de las que al menos 10 son responsables de las dermatofitosis humanas.⁴

El ministerio de salud del Perú (Minsa), informó que, en la región Loreto, el principal agente causal de las Onicomycosis, Tiña Corporis y Tiña Pedis fue la especie *Trichophyton*. También concluyeron que las dermatofitosis superficiales, son patologías dermatológicas prevalentes de los habitantes de las comunidades selváticas.⁵

Trichophyton rubrum es un hongo antropofílico que con frecuencia causa tinea corporis inflamatoria aguda o crónica, se ha evidenciado que desde 1970 existe una resistencia a los tratamientos típicos empleados en las micosis (fluconazol, terbinafina, ketoconazol e itraconazol), motivo por lo que los médicos tienen que cambiar los medicamentos aumentar la dosis y el tiempo de tratamiento lo que genera un considerable aumento en los costes del tratamiento.⁶

En los últimos años los estudios han logrado demostrar que los extractos de eucalipto muestran una fuerte actividad antifúngica. La actividad fungicida; sea mayor o menor depende de la especie de eucalipto de la que se obtenga el extracto y la concentración. *El Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus maculata* Hook inhiben fuertemente el crecimiento de hongos (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*), se cree que el mecanismo por el cual el aceite esencial destruye a los hongos es que puede atravesar su pared celular ocasionando una alteración de su ciclo biológico.⁷

La medicina alternativa, en la actualidad sigue siendo utilizada para la afección de enfermedades infecciosas. Se ha logrado demostrar a través de diversos estudios realizados a nivel mundial que los constituyentes de las plantas tienen una importante actividad antifúngica y antibacteriana. El extracto etanólico de *Eucalyptus globulus*, viene siendo utilizado en la fitoterapia tradicional, ya que posee propiedades antifúngicas, antibacterianas y antitumorales, estas propiedades son otorgadas (especialmente las antifúngicas), por el componente más abundante que es el 1,8-cineol (eucaliptol).⁸

Los aceites esenciales intervienen afectando las distintas etapas del desarrollo de los hongos como en el proceso de desarrollo de micelio, formación de estructuras

de penetración y esporulación. Su mecanismo de acción es originado debido a la ruptura de la membrana y la pared celular de los hongos por sus compuestos fenólicos.⁹

El problema que se plantea en el estudio es ¿Tiene efecto antimicótico el extracto oleoso de *Eucalyptus globulus* frente a *Trichophyton rubrum* ATCC10218 comparado a terbinafina 25µg in-vitro?

La investigación se justifica porque el *Trichophyton rubrum*, es el dermatofito que prevalece en las micosis superficiales siendo el de mayor importancia en el mundo, porque ocasiona la mayoría de infecciones en la piel, cabellos y uñas, ocasiona también una disminución en la calidad de vida en los pacientes infectados, así como una pérdida económica, debido a los gastos por el tratamiento.¹⁰

La transmisión de la dermatofitosis se produce por contacto directo con animales y humanos infectados siendo de manera rápida y fácil pudiendo llegar a producir una enfermedad de carácter crónico y lento. Por lo que el tratamiento es generalmente largo y costoso e implica el uso de medicamentos pertenecientes a las clases de alilamina y azol (terbinafina), los cuales, en la actualidad muestran una alta tasa de resistencia.¹¹

La mayoría de los pacientes abandonan el tratamiento farmacológico, por múltiples factores entre ellos tenemos el largo periodo de ingesta de los medicamentos, el elevado costo y las reacciones adversas que ocasionan. Sin embargo, la interrupción de la terapia antimicótica se asocia con recaídas, lo que influye en el aumento de la resistencia al tratamiento convencional.

Nuestro país cuenta con una gran diversidad de plantas utilizadas en la fitoterapia dentro las cuales tenemos al *Eucalyptus globulus* con múltiples estudios nacionales e internacionales que avalan las propiedades antimicóticas del aceite esencial, disminuyendo el tiempo de tratamiento los elevados costes y las reacciones medicamentosas.

Por ello es que esta investigación busca demostrar si el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* posee, un efecto antifúngico.

El trabajo de investigación tiene como objetivo general determinar si el extracto oleoso de *Eucalyptus globulus*, posee efecto antimicótico frente a *Trichophyton rubrum* ATCC10218, en comparación con terbinafina 25µg, in-vitro.

Los Objetivos Específicos: Establecer la actividad antifúngica del extracto oleoso de *Eucalyptus globulus* al 100%, 75%, 50%, frente a *Trichophyton rubrum* ATCC10218. Establecer el efecto antimicótico de Terbinafina frente a *Trichophyton rubrum* ATCC10218.

La hipótesis es H₁: El extracto oleoso de *Eucalyptus globulus*, posee efecto antimicótico frente a *Trichophyton rubrum* ATCC10218, en comparación con terbinafina 25µg, in-vitro. y H₀: El extracto oleoso de *Eucalyptus globulus*, no posee efecto antimicótico frente a *Trichophyton rubrum* ATCC10218, en comparación con terbinafina 25µg, in-vitro.

II. MARCO TEÓRICO.

Damjanović¹² (Montenegro, 2011), identificó 11 componentes en el aceite esencial *Eucalyptus globulus* Labill (cultivado en el país de Montenegro), analizó que el extracto etanólico duplicaba los halos de inhibición de la nistatina (14 mm y 46mm) a las distintas concentraciones, efecto de se atribuye al componente 1,8-cineol, conocido por inhibir el crecimiento de hongos. Posteriormente los analizó con el método de cromatografía y espectro de masas comprobando un efecto antimicrobiano y antimicótico bastante fuerte contra 17 microorganismos patógenos entre bacterias y hongos, en los que se incluye a *candida albicans* y *Trichophyton rubrum*.

Jack Ho¹³ (China 2015), En su estudio experimental investigó el mecanismo de la actividad antifúngica de *Macro carpiano c.* contra *Trichophyton mentagrophytes*, que puede causar tinea pedis. Extrajeron hojas frescas de *Eucalyptus globulus* con etanol al 95% luego se sometió purificación cromatográfica para dar *Macro carpiano c.* Se determinó su concentración mínima inhibitoria antifúngica (CMI. 0.06 mg/L), utilizaron como controles, clorhidrato de terbinafina y nistatina. Este estudio demostró que la acción antifúngica del *macro carpiano* se asoció con aumentos de permeabilidad de la membrana, y fragmentación de ADN.

Bolutari¹⁴ (Brazil 2015), En su estudio experimental evaluó a *Eucalyptus smithii* R.T. Baker y su efecto antimicótico en *Trichophyton rubrum* CCT 5507. Para determinar la actividad antifúngica del aceite utilizó los valores mínimos de concentración inhibitoria (62.5 ug/ml) y concentración mínima de fungicida (125 ug/ml), mostrando también en la microscopía electrónica de barrido (SEM), daños físicos y alteraciones morfológicas en los hongos expuestos a este aceite. Concluyendo de esta manera que el extracto oleoso de *Eucalyptus smithii* R.T, tiene un potencial efecto terapéutico contra las dermatofitosis.

Nidhi et al¹⁵ (India, 2018), realizó un estudio cuyo objetivo fue examinar los aceites de las hojas de eucalipto, en busca de propiedades antifúngicas contra cepas de *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*. El AE de *Eucalyptus globulus* mostró una

actividad antifúngica fuerte contra las cepas de *Trichophyton rubrum*, con halos de inhibición 17 ± 0.75 y 21 ± 1.02 mm. Concluyeron que el extracto oleoso de *Eucalyptus globulus* es un antimicótico de amplio espectro.

Alzate et al¹⁶ (Colombia 2012), evaluó el efecto del extracto oleoso de *Eucalyptus* sp (Myrtaceae), a distintas concentraciones, frente a *trichophyton rubrum*. Demostrando que el extracto oleoso de eucalipto inhibió completamente el crecimiento de estos hongos a 3000 ppm.

Alba et al¹⁷ (San Salvador 2011), determinó la actividad antimicótica del extracto oleoso del *Eucalipto* sobre *Trichophyton rubrum*. Con una concentración efectiva de 2000 ppm, fueron utilizadas diferentes concentraciones de aceite esencial para determinar la CMI y la Citometría de flujo (CMF) por el Método Kirby -Bauer. Evidenciándose que todos los aceites inhiben el crecimiento de los microorganismos de la prueba en comparación con el control positivo (ketoconazol al 1%).

Horna¹⁸ (Perú, 2017) en su estudio in vitro evaluó la susceptibilidad antifúngica de *Trichophyton rubrum* frente al extracto oleoso de *Eucalyptus globulus* en distintas concentraciones 100%, 75% y 50%, considerándose sensibilidad límite con un diámetro de inhibición entre 8-14 mm, sensibilidad media de 14-20, muy sensible > 20, y resistente <8 mm. Obteniendo como resultados que el mayor efecto antimicótico fue el del extracto oleoso de *Eucalyptus globulus* al 100% de concentración con el halo de inhibición máximo de 23,2 mm.¹⁸

La fitoterapia, en la actualidad es considerada como una terapia no agresiva, por tener menos efectos adversos frente al tratamiento convencional, además en el caso de los países megadiversos, como el Perú, está al alcance de gran parte de la población. Dentro de los métodos de procesamiento de fitoterapia existe el arrastre de vapor de agua, que tiene como resultado característico un olor intenso, denominado aceite esencial.¹⁹

Trichophyton rubrum, se encuentra dentro de un conjunto de hongos que se conocen como dermatofitos, y son capaces de causar enfermedades tanto en el ser humano como en los animales, sin embargo, por su capacidad de infectar generalmente al hombre es catalogado como un dermatofito antropofílico. Está distribuido muy ampliamente a nivel mundial.²⁰

Es capaz de invadir la piel, el cabello o las uñas; este hongo al igual de los otros que se encuentran en la agrupación de dermatofitos son queratinolíticos y queratinofílicos, por ello tienen la capacidad de degradar las superficies de queratina de las estructuras. Este agente invade sólo el estrato córneo, que corresponde a la epidermis, y de similar forma solo es capaz de invadir las capas queratinizadas que se encuentran más externas del cabello y uñas.²¹

Al examen microscópico el *Trichophyton* se presenta clásicamente como microconidios de característica alargada, redondeada en su porción distal, con pared lisa y delgada, con una medida de alrededor de 8 a 50 µm, y con número de septos que va de 4 a 6.²²

Se han descrito alrededor de 43 especies de dermatofitos, siempre es el *Trichophyton rubrum*, el agente que más se aísla en los casos de micosis superficiales, para poder hacer el diagnóstico clínico de las micosis se debía hacer un estudio micológico, observando el hongo a través del microscopio. Sin embargo en la práctica clínica es común la administración de antifúngicos.²³

La terbinafina pertenece a la familia de las alilaminas, y se caracteriza por su capacidad fungicida, queratinófila y muy lipófila, de administración sistémica o tópica para el tratamiento de las dermatofitosis; es capaz de interferir en las primeras etapas de la síntesis del ergosterol, a través de la inhibición de la enzima escualeno-epoxidasa, conllevando así a la rotura de la membrana fúngica y a la lisis posterior de la célula. Se distribuye muy bien en todos los tejidos y es capaz de fijarse en el estrato córneo tanto de la piel, uñas y del pelo.²⁴

Durante el proceso de infección, los dermatofitos, deben superar el sistema inmunitario innato del hospedero, que es la primera línea de protección contra estos organismos. La piel es una estructura física que está en exposición a la luz ultravioleta, a la falta de humedad y la microflora normal, estos factores hacen que la piel sea un ambiente inhóspito para el crecimiento de microorganismos patógenos. Otro factor de protección que tiene la piel es la constante renovación del estrato córneo que se produce por descamación de los queratinocitos.²⁵

Trichophyton rubrum en las primeras etapas de la infección, en respuesta al pH ácido de la piel humana, descomprime la síntesis de queratinasas y proteasas no específicas que actúan de manera óptima a un pH ácido. *T. rubrum* responde rápidamente a los cambios en el pH ambiente, al modular su perfil de expresión génica, por medio de este mecanismo el *Trichophyton rubrum*, puede evadir la primera respuesta inmunológica.²⁶

Para que se produzca una infección el *Trichophyton rubrum*, debe evadir el mecanismo de descamación de la piel, por lo que la infestación ocurre de manera rápida entre 3 a 4 horas después del contacto con el hongo. Esto es posible debido a que el *Trichophyton rubrum*, forma estructuras fibrilares largas que se conectan con las estructuras más profundas de la epidermis.²⁷

Una vez en el tejido del huésped, los dermatofitos o sus metabolitos inducen una respuesta inmune innata por parte de los queratinocitos, lo que activa mecanismos o mediadores de la respuesta inmune. Sin embargo, la respuesta inmune en la dermatofitosis es poco conocida, involucra mecanismos inespecíficos, así como el desarrollo de una respuesta humoral y celular. Ahora se acepta que la respuesta inmune mediada por células es responsable del control de la infección, ya que algunas personas desarrollan infección crónica y recurrente cuando se suprime esta respuesta celular.²⁸

En la actualidad se describen múltiples mecanismos de resistencia hacia los agentes antimicóticos, el principal mecanismo de resistencia es el adquirido, siendo

el más común la inducción de bombas de eflujo que son codificadas por los genes MDR O *CDR* y sus mutaciones.²⁹

III. MÉTODO

3.1 TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN:

Tipo de estudio: Básico³⁰

Diseño: Experimental de estímulo creciente con repeticiones múltiples, post prueba.³⁰ (Anexo 01)

3.2 VARIABLES (ANEXO 02)

Variable independiente: Agente antifúngico

- No farmacológico: Extracto oleoso de *Eucalyptus globulus*.
- Farmacológico: Terbinafina 25µg.

Variable dependiente: Efecto antifúngico

- Eficaz: halo inhibitorio igual o mayor que el agente farmacológico (>26mm).
- No eficaz: halo de inhibitorio menor que el agente farmacológico (<26mm).

3.3 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

Población: Cepas cultivadas de *Trichophyton rubrum* ATCC10218, en el Instituto Nacional de Salud

Criterios de inclusión:

las cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC10218 con 24 horas cultivadas.

Criterios de exclusión:

Cultivos de cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC10218 contaminadas.

Muestra: La cantidad de muestra se obtuvo utilizando la fórmula para comparar dos promedios, obteniéndose como muestra 10 repeticiones para cada grupo en estudio.³¹ (Anexo 03)

Unidad de análisis: todas las placas con las cepas de *Eucalyptus globulus*

Unidad de muestreo: Cada una de las placas Petri con los cultivos de las cepas de *Trichophyton rubrum*.³²

Muestreo: Probabilístico, aleatorio simple³²

3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD

La Técnica: Se empleó la técnica de campo experimental que consistió en visualizar de forma directa el crecimiento de las cepas de *Trichophyton rubrum* en todas las placas Petri.³⁰

Instrumento: Se elaboró una ficha de recolección de datos, para el registro de los resultados (zonas de inhibición), según la cantidad de repeticiones y las concentraciones del extracto oleoso, a las 24h. (Ver Anexo 04).

Validación y confiabilidad del instrumento. El instrumento fue validado por 02 expertos del área de microbiología y 01 de medicina. Todas las pruebas que se realizó en el laboratorio están enmarcadas en el protocolo de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)³³

3.5 PROCEDIMIENTO:

- I. *Eucalyptus globulus* fue recolectado durante la primavera del año 2020 en la provincia de Contumazá, departamento Cajamarca.
- II. Se procedió a realizar la Identificación de la taxonomía del vegetal por parte de la Universidad Nacional de Trujillo

- III. El extracto oleoso de *Eucalyptus globulus* fue obtenido a través del método de arrastre con vapor de agua. (Ver Anexo 06)
- IV. La evaluación de la susceptibilidad antifúngica fue usando el método de difusión en agar de Kirby-Bauer y para cultivar *Trichophyton rubrum* ATCC10218 se empleó Agar Sabouraud.

3.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

Todos los datos obtenidos registrados en la ficha de recolección de datos, se tabularon en el programa Excel versión 2019 y se vació en SPSS versión 26. Se utilizó la prueba estadística análisis de varianza (ANOVA) para la determinación de significancia entre grupos. Y la prueba TUKEY, para determinar la eficacia antimicótica.³²(Anexo 07)

3.7 ASPECTOS ÉTICOS:

Para el desarrollo de la investigación en el laboratorio, para la protección personal fueron tomadas en consideración la normatividad sobre bioseguridad determinadas por la OMS ³⁴ (Anexo 08)

La investigación se llevó cabo respetando el principio de ética que se encuentra adoptado en el código de ética del CMP, capítulo 6, Artículo 48.³⁵(Anexo 09)

Se cumplió con los criterios para la protección de la biodiversidad enmarcados en el artículo 24 de la Ley N°29763, Ley forestal y de fauna silvestre.³⁶(Anexo 10)

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Análisis descriptivo de los halos de inhibición del Efecto antimicótico del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* frente a *Trichophyton rubrum* ATCC10218 comparado a terbinafina, en un estudio in vitro.

Concentración	Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
			Límite inferior	Límite superior		
Terbinafina	33.00	1.491	31.93	34.07	30	35
50%	15.10	0.994	14.39	15.81	13	16
75%	21.00	0.816	20.42	21.58	20	22
100%	25.20	1.229	24.32	26.08	23	27

FUENTE: Software SPSS Versión 26.

Tabla 02. Análisis de Varianza de las medias del Efecto antimicótico del del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* frente a *Trichophyton rubrum* ATCC10218 comparado a terbinafina, en un estudio in vitro.

ANOVA.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1699.275	3	566.425	420.439	0.000
Dentro de grupos	48.500	36	1.347		
Total	1747.775	39			

FUENTE: Software SPSS VS 26

Tabla 03. Valoración Post ANOVA del Efecto antimicótico del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* frente a *Trichophyton rubrum* ATCC10218 comparado a terbinafina, en un estudio in vitro.

CONCENTRACIONES	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
50%	10	15.10			
75%	10		21.00		
100%	10			25.20	
Terbinafina	10				33.00
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

FUENTE: Software SPSS Versión 26.

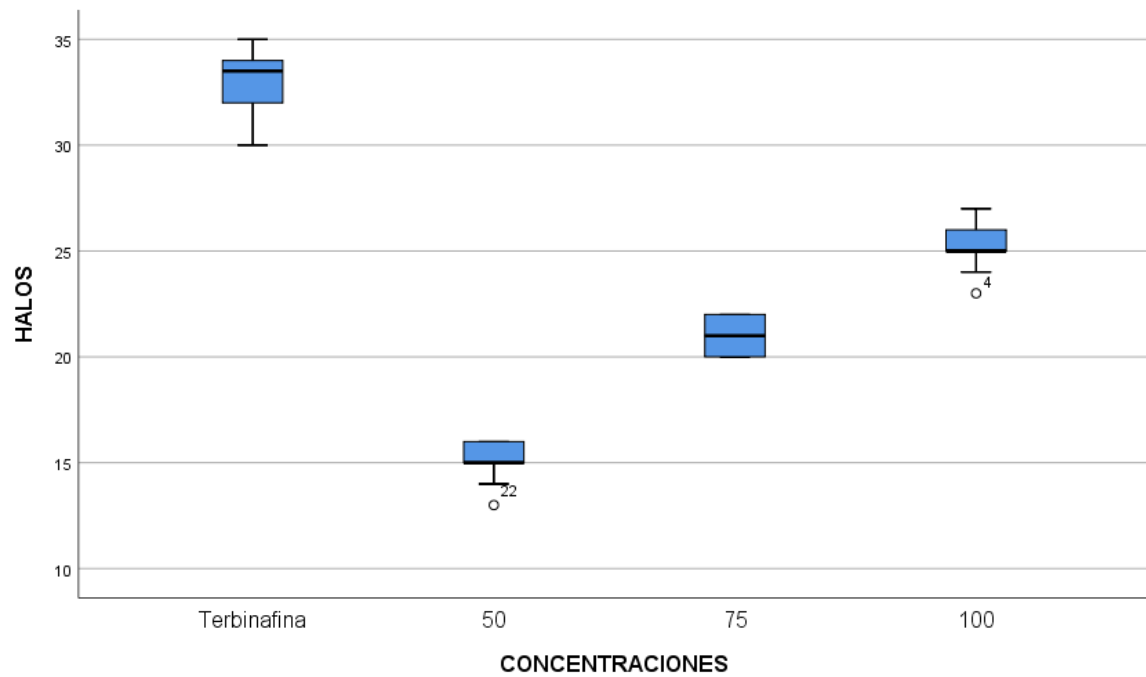


Figura 01. Diagrama de caja de los halos inhibitorios por los grupos estudiados del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* frente a *Trichophyton rubrum* ATCC10218 comparado a terbinafina, en un estudio in vitro.

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se evaluó el efecto antimicótico del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* frente a *Trichophyton rubrum* ATCC10218 comparado a terbinafina, utilizándose 10 repeticiones por cada grupo de estudio adicional al control neutro, observándose los resultados siguientes.

En la tabla 01, se muestra que el aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, en sus distintas concentraciones si tuvo efecto antimicótico, sin embargo no supera el rango de sensibilidad según lo considerado por los criterios del Estándar M. 60 de CLSI ($\geq 26\text{mm}$). Mayor inhibición se muestra a la concentración del 100% (25.20mm, $\text{DS}\pm 1.229$ IC95% 24.32 – 26.08). Terbinafina obtuvo mejores resultados de inhibición (33 mm, $\text{DS}\pm 1.491$ IC95% 31.93 – 34.07).

En la tabla 2 de de ANOVA, se observa que los grupos de estudio tuvieron diferencia significativa ($p: 0.000$), en la tabla 03 y figura 1, en relación al análisis Post Anova de Tukey, el grupo que evidencia mejor resultado inhibitorio la terbinafina seguida de aceite de *Eucalyptus globulus* al 100%.

Los resultados son similares a: Damjanović¹², quien identificó componentes en el aceite esencial *Eucalyptus globulus* Labill (1,8-cineol), obteniendo halos de inhibición entre (14 mm y 46 mm), comprobando efecto antimicótico contra *Trichophyton rubrum*, el cual, se le atribuye al 1,8-cineol.

Jack Ho¹³ menciona que las hojas de *Eucalyptus globulus*, presentan un componente denominado *Macro carpiano c*, obteniendo una concentración mínima inhibitoria antifúngica (CMI. 0.06 mg/L), Este estudio demostró que la acción antifúngica del *macro carpiano c*, se asoció con aumentos de permeabilidad de la membrana, y fragmentación de ADN. Asimismo, Bolutari¹⁴, obtuvo valores de concentración inhibitoria mínima (62.5 ug/ml) y concentración mínima fungicida (125 ug/ml), al someter a *Trichophyton rubrum* CCT 5507, al aceite esencial de *Eucalyptus* luego evidenció en microscopía electrónica daños físicos y alteraciones morfológicas en los hongos.

Nidhi et al¹⁵, examinó las propiedades antifúngicas de *Eucalyptus globulus*, contra *Trichophyton rubrum*, obteniendo halos de inhibición (17 ± 0.75 y 21 ± 1.02 mm), concluyó que el aceite esencial de *Eucalyptus*, es un antimicótico de amplio espectro.

Alzate et al¹⁶, Alba et al¹⁷, comprobaron la actividad antimicótica de *Eucalyptus* frente a *trichophyton rubrum*, obteniendo (2000 ppm – 3000 ppm), respectivamente.

Horna¹⁸, quien evaluó la susceptibilidad antifúngica de *Trichophyton rubrum* frente al extracto oleoso de *Eucalyptus globulus* en distintas concentraciones 100%, 75% y 50%, obteniendo halos de inhibición menores con 23.2mm a concentración del 100%.

El *Eucalyptus globulus*, tiene un efecto antimicótico, gracias a la composición de componentes que están incluidos en el aceite esencial (1,8 cineol, *Macro carpiano* c), los cuales son motivo de múltiples estudios, que aportan una importante evidencia científica. Además, es una alternativa, a los antifúngicos orales, ya que estos, generan resistencia por el uso prolongado e implican un costo importante por parte del paciente.

VI. CONCLUSIONES.

- El extracto oleoso de *Eucalyptus globulus*, tiene efecto antimicótico frente a *Trichophyton rubrum* ATCC10218, en las disoluciones del 75 al 100 %, por lo cual se acepta la hipótesis de investigación.
- El extracto oleoso de *Eucalyptus globulus*, al 50% no evidencia efecto antimicótico según criterios del Estándar M. 60 de CLSI (< 20mm).
- El mejor efecto antimicótico se obtiene a la concentración del 100%, por lo que se infiere que a mayor concentración mejor efecto antimicótico.
- La terbinafina 25µg, sigue siendo el tratamiento de elección para *Trichophyton rubrum* ATCC10218.

VII. RECOMENDACIONES.

- Incitar nuevos estudios, para determinar los componentes del extracto oleoso de *Eucalyptus globulus*, comprobar el efecto de estos en distintos medios de dilución (cetónico, acuoso).
- Fomentar la ampliación de estudios sobre las propiedades, antimicóticas y antibióticas de *Eucalyptus globulus*.
- Lograr aislar los componentes del extracto oleoso de *Eucalyptus globulus*, determinar cuál de esos, tiene actividad fungicida y bactericida.
- Realizar pruebas de *Eucalyptus globulus*, sobre modelos vivos, coadyuvando al tratamiento sistémico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Araceli M. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. Elsevier. 2016; 29(3): 5-12 (Citado: 20/07/19). Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/ccs-2009-micologia.pdf>
2. Folleco E, González F. Frecuencia de agentes etiológicos causante de micosis superficiales en el laboratorio de Micología Clínica de la Universidad del Cauca. Rev. Fac. Cienc. Salud Univ. Cauca .1 de abril de 2014;16(1):17-30. (Citado: 20/07/19). Disponible en: <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/rfcs/article/view/34>
3. Bejar V, Villanueva F, Guevara J, et al . Epidemiología de las dermatomicosis en 30 años de estudio en el Instituto de Medicina Tropical Daniel A Carrión, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. An. Fac. med. 2014 Abr; 75(2): 167-172. (Citado: 20/07/19). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832014000200013&lng=es.
4. Sánchez L, Matos R, Héctor K. Infecciones micóticas superficiales. Dermatología peruana. 2011; 19(3). (Citado: 20/07/19). Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v19_n3/pdf/a09v19n3.pdf.
5. DIGEMID. Revisión y actualización del Petitorio Nacional Único de Medicamentos Esenciales (PNUME). Lima: INFORME ETES-DAUM-DIGEMID/MINSA; 2014. (Citado: 20/07/19). Disponible en: <http://www.digemid.minsa.gob.pe/Main.asp?Seccion=686>

6. Sandoval N, Arenas R, Giusiano G, Garcia D. Diagnóstico y tratamiento de Dermatofitosis Y Pitiriasis Versicolor. Rev med hondur. 2012; 80(2). (Citado: 20/07/19). Disponible en: <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/2012/pdf/Vol80-2-2012-8.pdf>

7. Tyagi A, Malik A. In situ SEM, TEM and AFM studies of the antimicrobial activity of lemon grass oil in liquid and vapour phase against trichophyton rubrum. *Micron*. 2010;41(7):797-805. (Citado: 20/07/19). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20541428>

8. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. An Fac med. 7abr.2014;62(2):156-61(Citado: 20/07/19). Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/4167>

9. Ran X, Zhuang K, Ran Y. Tinea corporis on the stump leg with Trichophyton rubrum infection. Medical mycology case reports. 2015; 9(31). (Citado: 20/07/19). Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/281140740_Tinea_corporis_on_the_stump_leg_with_Trichophyton_rubrum_infection

10. Ruiz Escusol S, Guijarro Tapia E, Cardona Marqués A, Hernández Alabart MM, Muniain Díaz de Cerio MP, Martín Lorente AM et al . Epidemia de tiña por Trichophyton tonsurans en una escuela. Rev Pediatr Aten Primaria [Internet]. 2016 Dic; 18(72): 325-331. (Citado el 8/04/2019) Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322016000400009&lng=e

11. López R., Manzano P., Hernández F., Bazán E., Méndez LJ. Dynamics of dermatophytosis frequency in Mexico: an analysis of 2084 cases. *Med Mycol.* 2012 May;48(3):476-9. (citado: 5/08/2019). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19886762>

12. Damjanović-Vratnica, B., Đakov, T., Šuković, D., & Damjanović, J. Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. *Czech Journal of Food Sciences.* 2011; 29(3), 277-284. (Citado: 20/07/19). Disponible en: https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/114_2009-CJFS.pdf

13. Wong JH, Lau KM, Wu YO, et al. Antifungal mode of action of macrocarpal C extracted from *Eucalyptus globulus* Labill (Lan An) towards the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*. *Chin Med.* 2015;(10)34. Published 2015 Nov 21. (Citado: 20/07/19). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4654844/#Sec1title>

14. Bolutari E, Danielle C. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Eucalyptus smithii* against dermatophytes. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015 Nov; 48(6). (Citado: 20/07/19). Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/286510624_Chemical_composition_and_antifungal_activity_of_essential_oil_from_Eucalyptus_smithii_against_dermatophytes

15. Nidhi P, Kumari R, Thakur. Role of Essential Oils of Medicinal Plants (*Eucalyptus Globulus*, *Thuja Occidentalis*, *Rosmarinus Officinalis*, *Lavandula Officinalis*) to Treat Broad Spectrum Bacterial and Fungal Pathogens and as Antioxidants in Food and Health. *SSRN Electronic Journal.* 2018; 14(1). (Citado: 20/07/19). Disponible en:

https://www.researchgate.net/figure/Summary-of-the-functional-groups-of-essential-oils-of-Eucalyptus-globulus-Thuja_tbl3_329930366

16. Alzate N, López A. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos hongos filamentosos. Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares (GIEM) Universidad de Antioquia. 2009; 1(4). (Citado: 20/07/19). Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3631002>
17. Alba L, Hernández A, Valladares M. Determinación de la actividad antifúngica de aceites esenciales extraídos de *lippia graveolens* (orégano), *rosmarinus officinalis* (romero) y *eucalyptus globulus* (eucalipto) en *microsporum canis* *trichophyton rubrum* y *epidermophyton floccosum*. El salvador: facultad de química y farmacia; 2011. (Citado: 20/07/19). Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/3147/>
18. Horna A. Suceptibilidad antimicótica in vitro de *Microsporum canis* y *Trichophyton rubrum* al aceite esencial de *Eucalyptus globulus*. tesis. Trujillo Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2017. (Citado: 20/07/19). Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/9612>.
19. Aranzábal A, Quiñones L, Dante M, Verastegui D, Robles E, Juana M. Investigación traslacional para el desarrollo de la fitoterapia en Perú. *Rev. gastroenterol. Perú*. 2016 Ene; 36(1):93-93. (Citado: 20/07/19). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292016000100015&lng=es.
20. Manzano P. Dermatofitosis. Gupta: Facultad de Medicina, UNAM, Departamento de Microbiología y Parasitología; 2017. (Citado: 20/07/19). Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/dermatofitosis.html>

21. Zhan P, Liu W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide. *Mycopathologia*. 2017;182(1-2):77-86 (Citado: 20/07/19). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27783316>
22. Arenas R. Micología médica ilustrada 4a. ed. Mexico: McGraw Hill; 2013. 120p. (Citado: 20/07/19).
23. Patrick R. Murray, PhD, Ken S. Rosenthal, PhD. Review of Medical Microbiology. ed ilustrada. Elsevier Health Sciences, 2012. 144p (Citado: 20/07/19).
24. William E, Peter G. Pappas, Jack D. Sobel. Clinical Mycology. Elsevier Health Sciences, 2011. 121p. (Citado: 20/07/19).
25. Moret S, Dídac P, Fitó T, Anna L. Dermatología en Atención Primaria. 1ª. Ed. Editorial Medica Panamericana. 2017. 220p. (Citado: 20/07/19).
26. Uribe MP, Cardona-Castro N. Mecanismos de adherencia e invasión de dermatofitos a la piel. Rev CES Med 2013; 27(1): 67-75 (Citado: 20/07/19). Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v27n1/v27n1a07.pdf>
27. Carroll.C.Karen. Microbiología Médica. 27th ed. España: McGraw-Hill; 2016. (Citado: 20/07/19). Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/qa.aspx?resourceid=1838>
28. Klus.W at E. Fitzpatrick Dermatología en Medicina General. 8th ed. España: Panamericana; 2014. (Citado: 20/07/19).
29. Yamada, T., Maeda, M., Alshahni, M. M., Tanaka, R., Yaguchi, T., Bontems, O., Salamin, K., Fratti, M., & Monod, M. Terbinafine Resistance of

- Trichophyton Clinical Isolates Caused by Specific Point Mutations in the Squalene Epoxidase Gene. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2017 61(7), (Citado: 20/07/19). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5487658/>
30. Sampieri H, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 6th ed. México D.F.: McGraw Hill; 2016. (citado:04/12/19)
31. García J, Reding A, López J. Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación. ELSEVIER. 2013 agosto; 2(8). (citado: 5/12/2019). Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=349733226007>
32. Wayne D. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta. Edición México: Limusa 2006. (citado: 5/12/2019).
33. García J, González J, Orta N, Sánchez M. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio clínico. SEIMC. 2017. (citado: 05/10/2019). Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>
34. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. MANUAL DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO. 3rd ed. Ginebra: OMS; 2005. (citado: 05/10/2019). Disponible en: https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf
35. Colegio Médico del Perú. Código de Ética y Deontología. Lima: CMP; 2007. (citado: 11/09/2019)

36. Ley forestal y de fauna silvestre. Publicado en el diario oficial El Peruano, Ley n.º 29763, (22 de julio, 2011) . (citado: 06/08/2019). Disponible en: <http://www.leyes.congreso.gob.pe/Documentos/Leyes/29763.pdf>
37. Zurita Macalupú Susana. Situación de la resistencia antifúngica de especies del género Candida en Perú. Rev. Perú. med. exp. salud pública. 2018 Ene 35(1):126-131. (Citado: 07/08/2019) Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342018000100019&lng=es.
38. Tapia Cecilia. Antifúngicos y resistencia. Rev. chil. infectol. 2012; 29(3): 357-357. (Citado 7/08/19) Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000300020&lng=es.
39. R.K .Agarwa I S.Gu pta G.M ittal , F. Kha n S.Roy, A.Aga rwa I. Antifunga I Susceptibility Testing of Dermatophytes. International Journal Current Microbiology and Applied Sciences. 2015; 4(3). (Citado: 07/08/2019) Disponible en <https://www.ijcmas.com/vol-4-3/R.K.Agarwal,%20et%20al.pdf>
40. Patiño L, Saavedra A, Martínez J. Extracción por arrastre de vapor de aceite esencial del romero. Bolivia: Universidad Mayor Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca, Ciencias Tecnológicas; 2014.
41. MINISTERIO DE SALUD. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima: Ministerio de salud. Instituto nacional del Perú. 2002. (citado: 08/10/2019). Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>

ANEXO 01

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5

Dónde:

RG1-5: Grupos aleatorios de cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC10218

X1: Extracto oleoso de *Eucalyptus globulus* al 100%

X2: Extracto oleoso de *Eucalyptus globulus* al 75%

X3: Extracto oleoso de *Eucalyptus globulus* al 50%

X4: Control negativo DMSO (Dimetil Sulfóxido)

X5: Control positivo (Terbinafina 25µg)

O1-5: Efecto antifúngico (zona de inhibición).

ANEXO 02

OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
V.I. Agente antimicótico	<p>Es una sustancia química, que produce una alteración en el ciclo micótico. (37)</p> <p>Para el tratamiento del <i>trichophyton rubrum</i> se utilizó:</p> <p>Tratamiento no farmacológico con Eucalyptus globulus “eucalipto”.</p> <p>Tratamiento no farmacológico con Terbinafina 25µg.</p>	<p>La población fue dividida en los siguientes grupos</p> <p>a)100%</p> <p>b)75%</p> <p>c)50%</p> <p>d)Terbinafina 25µg</p> <p>e) DMSO (Dimetil Sulfóxido)</p>	<p>RG1</p> <p>RG2</p> <p>RG3</p> <p>RG4</p> <p>RG5</p>	Cualitativa nominal
V.D. Efecto antifúngico	<ul style="list-style-type: none"> • Acción ejercida por el agente sobre los hongos, para eliminarlos o inhibirlos (38). • Inhibición de la enzima escualeno epoxidasa de la membrana celular del hongo, bloqueando así la síntesis de ergosterol (acción fungistática). Lo que ocasiona acumulación anormal intracelular de escualeno (acción fungicida) 	<p>Se midió la zona de inhibición de crecimiento, considerando los criterios del Estándar M. 60 de CLSI(39)</p> <p>Sensible: \geq 26mm</p> <p>Intermedio: 20-26 mm</p> <p>Resistente: <20 mm</p>	<p>Eficaz</p> <p>No eficaz</p>	Cualitativa nominal

ANEXO 03

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Fórmula:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

Dónde:

$Z_{\alpha/2}$: 1,96. Para un intervalo de confianza del 95%. (31)

Z_{β} : 0,842 (31)

X_1 : 27 mm Zona de inhibición de la terbinafina. (39)

X_2 : 23.2 mm Zona de inhibición del *Eucalyptus globulus* (18)

σ : 3.08 mm (18)

n = 10.3

Para este estudio se obtuvo 10.3 repeticiones para cada grupo en estudio.

Sin embargo, se trabajará con 11 repeticiones por grupo.

ANEXO 04

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS PARA MEDIR EL DIÁMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICION (mm) SOBRE CEPAS DE *Trichophyton rubrum* ATCC10218.

PATÓGENO <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC10218	CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Eucalyptus globulus</i>			CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
	100%	75%	50%	TERBINAFINA 25 µg	DSMO
	Diámetro del halo de inhibición (mm). de inhibición (mm)				
PLACA 1	26	22	16	34	0
PLACA 2	27	22	13	33	0
PLACA 3	25	20	16	34	0
PLACA 4	23	21	16	30	0
PLACA 5	25	20	15	32	0
PLACA 6	27	22	15	34	0
PLACA 7	24	21	14	35	0
PLACA 8	25	21	15	32	0
PLACA 9	25	20	15	32	0
PLACA 10	25	21	16	34	0

ANEXO 05

FICHA DE EVALUACIÓN DE DATOS.



ANEXO N° 02

FICHA DE EVALUACIÓN INSTRUMENTO POR EXPERTO

ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS							
	CONTENIDO (Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)		CONSTRUCTO (Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)		RELEVANCIA (El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)		COHERENCIA INTERNA (El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)		CLARIDAD (El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)		SUFICIENCIA (Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1	X		X		X		X		X		X	
2	X		X		X		X		X		X	
3	X		X		X		X		X		X	
4												
5												

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS GENERALES				SI	NO	OBSERVACIONES
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos				X		
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación				X		
Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial				X		
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiera los ítems a añadir				X		
VALIDEZ						
APLICABLE	X	NO APLICABLE		APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN		

Validado por:

Fecha

Jaime A. Polo Gamboa
MICROBIOLOGO
CBP 4551

Dr. José Luis Fernández Sosa
MÉDICO CIRUJANO
C.M. 159

Hospital Regional Docencia de Tr. G.
Dr. Orlando Solari Riquelme
RESIDENTE EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
CMP. 11933

}

ANEXO 06

PROCEDIMIENTO

1. La identificación taxonómica de la planta se realizó en el Herbario de la Universidad Nacional de Trujillo.



2. El extracto oleoso de *Eucalyptus globulus* fue obtenido a través del método de arrastre con vapor de agua.

A. Tratamiento de la muestra

Las plantas frescas de *Eucalyptus globulus* “eucalipto” se colectaron en la ciudad de Contumazá, Región Cajamarca, Perú, en una cantidad de 8 Kg



aproximadamente y se llevaron al laboratorio de Microbiología donde se seleccionaron las hojas con buenas condiciones; de este modo, se obtuvo la “muestra fresca” (MF). La MF se lavó con agua destilada clorada y se llevó a un horno a 40-45°C por 3-4 días donde se deshidrató. Después, se estrujaron manualmente las hojas secas hasta que se obtuvo partículas muy pequeñas y se reservaron almacenándolas herméticamente en bolsas negras. A esto se le consideró como “muestra seca” (MS).



B. Obtención del Aceite Esencial

El aceite esencial de *Eucalyptus globulus* se obtuvo por el método de arrastre de vapor de agua; para ello, en un balón de 2 L se colocó 1,5 L de agua destilada y en un balón de 4 L se colocó la MS hasta que llenó las 3/4 partes del balón. Ambos balones se taparon herméticamente y estuvieron conectados a través de un ducto. Al mismo tiempo el balón con la MS estuvo conectado a un condensador recto (refrigerante), el

cual desembocó en un embudo decantador tipo pera. Así, el balón con agua se calentó con una cocina eléctrica y el vapor de agua pasó a través del ducto hacia el balón con la MS y arrastró los componentes fitoquímicos (incluido los lípidos). Este vapor se condujo hacia el condensador en donde se convirtió en líquido que fue recepcionado por un decantador tipo pera. Este líquido se disoció en dos fases, y quedó el aceite en la superficie por diferencia de densidades. Este proceso se realizó en 4 horas aproximadamente. De este modo, se obtuvo el Aceite Esencial (AE) considerado al 100%; el cual, se colocó en un frasco de vidrio ámbar y se reservó a 4°C hasta su utilización.



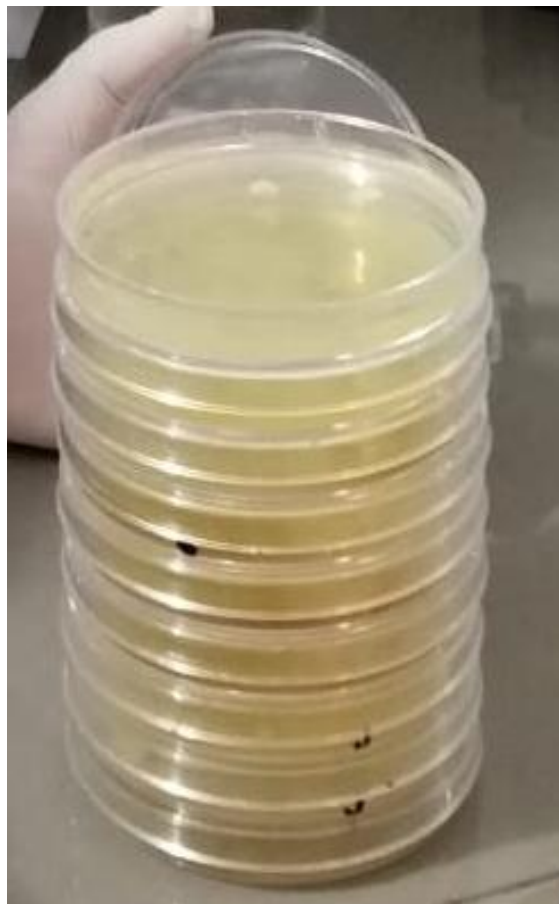
Preparación de Agar Sabouraud y cultivo de *Trichophyton rubrum*

1. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó agar Sabouraud glucosado como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 10 placas Petri. Este medio de cultivo se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que solidificó completamente.

2. Cultivo de *Trichophyton rubrum*

Se reactivó la cepa de *Trichophyton rubrum* cultivándolo por picadura en la parte central de 2 placas Petri con agar Sabouraud. Después, se envolvió en papel Kraft y se dejó en un lugar oscuro y húmedo, hasta que creció y esporuló, por 15 días aproximadamente, se observó permanentemente su crecimiento.



PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD

Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar) Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomó en cuenta los estándares M60.

- a) Preparación del inóculo** El inóculo se preparó colocando 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *Trichophyton rubrum*, cultivado hace 24 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml).



- b) Siembra del microorganismo** Se sembró el microorganismo *Trichophyton rubrum*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizó sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.



c) Preparación de las concentraciones del AE A partir del AE al 100%, se prepararon 2 concentraciones (75% y 50%) utilizando como solvente Dimetil Sulfóxido (DMSO); para ello, se rotularon 3 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 3 concentraciones y se colocó 750 μ L de AE y 250 μ L de DMSO al tubo de 75%, 500 μ L de AE y 500 μ L de DMSO al tubo de 50%



Preparación de los discos de sensibilidad con AE

A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10 μ L en cada disco de papel filtro Whatman N° 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomó 10 μ L de AE al 50% en y se colocaron en un disco, 10 μ L de AE al 75% en otro disco y 10 μ L de AE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 10 veces.



d) Confrontación del microorganismo con el agente antimicótico

Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con AE, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *Trichophyton rubrum*, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con Terbinafina 25µg (control positivo). Se dejaron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 48 horas.



e) Lectura e interpretación

La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de AE de *Eucalyptus globulus* y para el terbinafina. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M60 del CLSI

ANEXO 07
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Pruebas de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Se basa en la media	1.385	3	36	0.263
Se basa en la mediana	1.122	3	36	0.353
Se basa en la mediana y con gl ajustado	1.122	3	30.393	0.356
Se basa en la media recortada	1.387	3	36	0.262

Pruebas de normalidad

CONCENTRACIONES	Kolmogorov-Smirnov^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Terbinafina	0.249	10	0.080	0.899	10	0.215
50	0.260	10	0.054	0.829	10	0.033
75	0.200	10	,200*	0.832	10	0.035
100	0.265	10	0.046	0.899	10	0.212

Comparaciones múltiples

Variable dependiente:

HSD Tukey

CONCENTRACIONES		Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Terbinafina	50	17,900*	0.519	0.000	16.50	19.30
	75	12,000*	0.519	0.000	10.60	13.40
	100	7,800*	0.519	0.000	6.40	9.20
50	Terbinafina	-17,900*	0.519	0.000	-19.30	-16.50
	75	-5,900*	0.519	0.000	-7.30	-4.50
	100	-10,100*	0.519	0.000	-11.50	-8.70
75	Terbinafina	-12,000*	0.519	0.000	-13.40	-10.60
	50	5,900*	0.519	0.000	4.50	7.30
	100	-4,200*	0.519	0.000	-5.60	-2.80
100	Terbinafina	-7,800*	0.519	0.000	-9.20	-6.40
	50	10,100*	0.519	0.000	8.70	11.50
	75	4,200*	0.519	0.000	2.80	5.60

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANEXO 08

Protección personal

1. En todo momento el personal de laboratorio deberá portar, batas o uniformes especiales.
2. Para los procedimientos que involucren o puedan entrañar el contacto directo o accidental con líquidos corporales, sangre, animales infectados o materiales con potencial infeccioso se deberá usar obligatoriamente guantes protectores apropiados, que una vez terminado el procedimiento se deberán retirar de forma aséptica y a continuación se llevará el lavado de manos.
3. Después de la manipulación de animales o materiales infecciosos el personal deberá lavarse las manos. así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
4. Cuando sea necesario la protección de los ojos, rostros de impactos, salpicaduras y fuentes de radiación artificial se usarán gafas de seguridad, viseras u otros dispositivos de protección.
5. Estará prohibido el uso de las prendas protectoras fuera del laboratorio.
6. No se usará calzado sin puntera.
7. Estará prohibido actos como fumar, comer, beber, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto en las zonas de trabajo
8. Estará prohibido el almacenamiento de bebidas o alimentos para consumo humano en las zonas de trabajo del laboratorio.
9. La ropa protectora de laboratorio se guardará en otros armarios o taquillas que la ropa de calle.

ANEXO 09

Art. 48: "El médico debe presentar la información proveniente de una investigación médica, para su publicación, independientemente de los resultados, sin incurrir en falsificación ni plagio y declarando si tiene o no conflicto de interés".

ANEXO 10

LEY FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE

LEY N° 29763

Artículo 4. Patrimonio forestal y de fauna silvestre de la Nación ³⁶

El patrimonio forestal y de fauna silvestre de la Nación está constituido por lo siguiente:

- a. Los ecosistemas forestales y otros ecosistemas de vegetación silvestre.
- b. Los recursos forestales y de fauna silvestre mantenidos en su fuente.
- c. La diversidad biológica forestal y de fauna silvestre, incluyendo sus recursos genéticos asociados.
- d. Los bosques plantados en tierras del Estado.
- e. Los servicios de los ecosistemas forestales y otros ecosistemas de vegetación silvestre.
- f. Las tierras de capacidad de uso mayor forestal y tierras de capacidad de uso mayor para protección, con bosques o sin ellos.
- g. Los paisajes de los ecosistemas forestales y otros ecosistemas de vegetación silvestre en tanto sean objeto de aprovechamiento económico.

Las plantaciones forestales en predios privados y comunales y sus productos se consideran recursos forestales pero no son parte del patrimonio forestal y de fauna silvestre de la Nación.



CONSTANCIA DE ASESORÍA DE PROYECTO DE TESIS

El que suscribe, Polo Gamboa, Jaime Abelardo docente de la Escuela Profesional de Medicina de la Facultad de Ciencias Médicas.

Hace CONSTAR

Que, de conformidad con el Reglamento para elaboración y evaluación de Proyectos de Tesis, el(la) estudiante Florán López, Antony Napoleón de esta Superior Casa de Estudios, viene trabajando bajo mi asesoramiento el Proyecto de Tesis titulado:

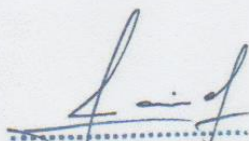
Efecto antimicrotico del aceite esencial de Eucalyptus globulus frente a Trichophyton rubrum ATCC 10218 comparado a Terbinafina, en un estudio in vitro.

que será presentado para optar el Título Profesional de Médico Cirujano.

En tal virtud, asumo el asesoramiento del Proyecto mencionado en calidad de ASESOR ESPECIALISTA, tarea voluntaria y de cooperación académica con la Escuela de Medicina.

Expedido el presente a solicitud de la parte interesada sólo para fines académicos que estime conveniente.

Dado en la ciudad de Trujillo a los 09 días del mes de Mayo del año 2020.


Jaime A. Polo Gamboa
MICROBIOLOGO
CBP 6951

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha cedido *ad honorem* sus instalaciones, en donde ANTONY NAPOLEÓN FLORIÁN LÓPEZ, estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Efecto antimicótico del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* frente a *Trichophyton rubrum* ATCC10218 comparado a terbinafina, en un estudio in vitro", durante los días 17 al 22 de octubre de 2020, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud del estudiante, sólo para fines académicos, a los 27 días del mes de octubre de 2020.


José Luis Callo Quevedo
BIOLOGO - MICROBIÓLOGO
C.B.P. 0301

Sede Principal: Francisco Bolognesi 678 Of. 203 - Centro Histórico - Trujillo

Sucursales: Los Corales 277- Barrio Médico Urb. Santa Inés - Trujillo

☎ 769999 - ☎ 948649844

✉ sanjoselabs@hotmail.com 🌐 www.sanjoselabs.amawebs.com/